

Charcot-Marie-Tooth betegség és kapcsolódó perifériás
neuropátiák: a genetikai vizsgálatok szerepe

Ph.D. Tézisek

Dr. Szigeti Kinga

Konzulens: Dr. Vécsei László Egyetemi Tanár,
Akadémikus

Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi
Centrum
Szegedi Tudományegyetem

2006

ELŐZMÉNY

Az örökletes motoros és szenzoros neuropátiák vagy Charcot-Marie-Tooth (CMT) betegség és kapcsolódó neuropátiák egy heterogén csoportja a perifériás idegrendszert érintő örökletes betegségeknek, melynek becsült előfordulási gyakorisága 1 a 2500-hoz. CMT klinikailag egy lassan progrediáló távolság dependens neuropátia, mely distálisan kezdődő, proximálisan terjedő parézis és szenzoros deficit jellemez, mely először az alsó, majd a felső végtagokban is jelentkezhet. Motoros idegvezetési sebesség alapján (NCVs) két fő típust különböztetünk meg: 1-es vagy demyelinizációs (CMT1) típus (ebben az esetben öröklődési módtól függetlenül), melyet szimmetrikusan lassult NCV (általában < 38 m/s; normál > 45 m/s) és 2-es vagy axonális típus (CMT2) (szinten öröklődési módtól függetlenül) melyet normál vagy szubnormális NCV és csökkent izom összetett akciós potenciál (CMAP) jellemez. Myelinopátiában szenvedő betegek patológiai vizsgálata szegmentális demyelinizációt és remyelinizációt mutat pl. "onion bulb" képződéssel, addig az axonopátiás betegek idegei normál myelint de csökkent számú idegrostot mutat.

A betegség mindkét fajtája, CMT1 és CMT2, is örökölhető mind autoszómális domináns, autoszómális

recesszív ill.X kromoszómához kötött módon, de gyakran sporadikus módon jelentkeznek. A betegség spektruma egy kontinuumon helyezkedik el, gyakran ugyanabban a családban súlyos újszülöttkorban jelentkező fenotípustól enyhe felnőttkorban jelentkező tünetekig megtalálható a betegség teljes spektruma. A tradicionális klinikai klasszifikáció a Dejerine-Sottas neuropátiát és a kongenitális hypomyelinizációs neuropátiát is magában foglalja. Definíció szerint a Dejerine-Sottas neuropátia diagnózisa megkívánja a korai fejlődés késetségét, mely nagyon korai kialakulásra utal. A kongenitális hypomyelinizációs neuropátia definíciója átfed a Dejerine-Sottas neuropátia klinikai diagnózisával, a terminológia veleszületett tünetekre utal; mégis a tünetek felismeréséhez gyakran a korai fejlődés elmaradottsága vezet ebben a csoportban is. A Dejerine-Sottas neuropátia és a kongenitális hypomyelinizációs neuropátia megkülönböztetéséhez patológiai diagnózis kell, az „onion bulb” léziók Dejerine-Sottas neuropátiában de- és remyelinizációs epizódokat jeleznek.

Az elmúlt évtizedben óriási mennyiségű információ került felismerésre a perifériás idegek funkciójával és diszfunkciójával kapcsolatban az örökletes neuropátiákat okozó gének felismerésével, mely komplex klinikai

klasszifikációhoz vezetett a szereplő gének és lókuszek alapján. Mégis, bizonyos esetekben ugyanabban a génben lévő mutációk mind demyelinizációs, mind axonális neuropátiát okozhatnak, ugyanaz a mutáció ugyanabban a családban különböző súlyosságú kórképhez vezethet, és az öröklődési minta ugyanazon gén viszonylatában különbözhet attól függően, hogy domináns negatív vagy funkció vesztéssel jár-e a mutáció. Ezért hamarosan a klasszifikáció revíziójára lesz szükség, a szövegben CMT1 és CMT2 a demyelinizációs és axonális CMT-re vonatkozik külön-külön, öröklődési mintától függetlenül. Néhány ezen mutációk/gének közül az örökletes neuropátiák jelentős frakcióját okozzák, így a molekuláris analízis jelentős szerepet játszik precíz etiológiai diagnózis felállításában, míg más gének csak a betegek kis részében szerepelnek etiológiai faktorként.

MÓDSZEREK

Betegek

CMT és kapcsolódó neuropátiák diagnózisával rendelkező betegek orvosi dokumentációját átnéztük a diagnózis megerősítése végett. Ezen a vizsgálatokat a Baylor College of Medicine, Houston (Texas) etikai bizottsága jóváhagyta.

Mutáció szűrés

A betegek beleegyező nyilatkozata után vért vettünk, majd DNS-t izoláltunk QIAamp DNA Blood Mini Kit-tel (Qiagen, CA) és Puregene DNA isolation kit-tel (Gentra Systems, MN). A kódoló exonokat körülvevő primereket terveztünk a Primer3 program segítségével. A PCR produktumokat SAP-pal és exonukleázzal kezeltük (Amersham). Ezek a produktumok kerültek szekvenálásra dye-primer metodikával (Applied Biosystems) és elektroforetikus szeparálásra az ABI 377 automatizált szekvenáló géppel. A kromatogramokat a Sequencher software csomaggal analizáltuk (ACGT Codes). A mutáció megerősítésére restriktációs endonukleáz hasítási hely vesztés vagy létrehozás szolgált, amelyeket NEB Cutter-rel kerestünk és a megfelelő enzim és puffer kombinációjával emésztettük, majd elektroforézissel szeparáltunk.

Szekvencia analízis

A mutációk számozására egy széles körben elfogadott kritériumok alapján történt (den Dunnen and Antonarakis, 2000). A DNS mutációk számozása a cDNS szekvencia alapján történt, melyet “c”-vel jelöltünk a szám előtt és +1 az ATG transláció iniciációs kodon A nukleotidjának felel meg a referencia szekvenciában. A nucleotide változásokat NNSplice

programmal analizáltuk hogy splicing junkciók változásának valószínűségét megállapítsuk. A missense mutációk klinikai relevanciájának becslésére a Granthams' skálát használtuk. Továbbá az adott aminosav fontosságát a fajok közti konzerváció mértékévl becsültük, a régiókat BLASTP-nel analizáltuk és többszörös összehasonlítást végeztünk a Clustatx és NJPlot programokkal.

In vitro mutagenesis

Az expressziós vektorokat a pcDNA3.1(+) vector (Invitrogen) felhasználásával hoztuk létre. A vad-típusú *EGR2* kódoló szekvenciát az EST 362693 fragmentumról amplifikáltuk (GenBank szám aa018140) a következő pimerekkel: BamHIF (5[prime]-CGCGGATCCCCACCA TGGTGACCGCCAAGGCCGTAGAC-3[prime]) és XbaIR (5[prime]-GCTCTAGATCAAGGTGTCCGGGTCCGAG-3[prime]). A vad-típusú PCR fragmentumot a *Bam*HI és *Xba*I restriktációs enzimekkel emésztettük és a pcDNA3.1(+) vektorba klónoztuk. A vad-típusú vektort használva templátként a mutáns konstrukciókat (I268N, S382R, R409W, R359W és E412K) a QuikChange site-directed mutagenesis kit-tel (Stratagene) hoztuk létre. A DNS szekvenciákat fluorescens automatizált szekvenálással ellenőriztük. A luciferáz konstrukció tartalmazta a két *EGR2* konszenzus kötő

helyet és a transzfekció kontrollja a CMV-promóteres *lacZ* reporter volt.

Sejt kultúra kondíciók és tranziens transzfekció esszé

HeLa sejteket 10 % FBS-szel szuplementált DMEM-ben propagáltuk. A sejteket 12-rekeszű edénybe ültettük (Corning, Boston, MA) 3.5×10^4 sejt/ml koncentrációban és 1 napig inkubáltuk a transzfekció előtt. A transzfekciót 250 ng luciferáz reporter, 50 ng CMV-promóteres *lacZ* reporter és a megfelelő mennyiségű expressziós plazmiddal végeztük. Bluescript plazmidot (Stratagene) adtunk hozzá hogy az össz DNS transzfekciónként 2 μ g legyen. A sejteket 48 óra inkubáció után begyűjtöttük és a luciferáz esszét standard protocol alapján végeztük. Az átlagos luciferáz aktivitást a [beta]-galactosidáz aktivitásra normalizáltuk.

Pubmed kutatás a frekvenciák megállapításához

A különböző génekben szereplő mutációk frekvenciájának meghatározásához PubMed keresést végeztünk a *charcot* és *mutation* (734 hits) szavakkal és az absztraktokat elemezve 11 populáció alapú tanulmányt azonosítottunk.

EREDMÉNYEK

1. Evidencia-alapú irányelvek felállításához az irodalomból 10 különböző etnikai háttérből származó populáció-alapú tanulmányt azonosítottunk. Ezek a tanulmányok 5 gént/genom újrendeződést vizsgáltak: *PMP22* duplikáció/deléción; *MPZ*, *Cx32* és *PMP22* pont mutációk. Azon génekre, amelyekre populáció-alapú adatok nem állnak rendelkezésre, a saját 153 egymást követő CMT betegből álló kohortunkat használtuk, akiket klinikailag klaszifikáltunk a genetikai tesztek elérhetősége előtt (prekommerciális időszak). 14 gén/genom újrendeződést vizsgáltunk (*PMP22* dup/del, pont mutációk *Cx32*, *MPZ*, *PMP22*, *EGR2*, *PRX*, *NEFL*, *SOX10*, *SIMPLE*, *GDAP1*, *LMNA*, *TDPI*, *MTMR2*-ben) hogy a gének relatív frekvenciáját megbecsüljük. A populáció alapú tanulmányokban kapott frekvenciák az 5 génre/genom újrendeződésre hasonlóak voltak a mi kohortunkban is, sugallva, hogy a többi génre vonatkozó becslések megfelelőek. Azon gének frekvenciája, amelyeket a populáció-alapú tanulmányokban nem vizsgáltak csak a neuropátiás betegek kis százalékában (<1%) okoznak betegséget. Klinikai diagnosztikus laborokban a relatív frekvenciák hasonlóak voltak, megerősítve a populáció-alapú és saját vizsgálatainkat.

2. Az *EGR2* génben talált mutációk a Charcot-Marie-Tooth betegség széles spektrumát okozzák. Míg az *EGR2* mutációk ritkák, súlyos légzéselégtelenségről és halálról beszámoló esettanulmányok aggasztóak az ilyen betegeket kezelő orvosok számára. 10 egymást követő beteget azonosítottunk *EGR2* mutációval majd több év után kontrol vizsgálatokat végeztünk a betegség progressziójának és légzési elégtelenség jelenlétének megállapítására, hogy a betegség természetes lefolyását karakterizáljuk. Az átlag követési idő 17.5±10 év volt. 3 beteg AD, 3 AR öröklődésű családból származott, és 4 beteg CMT betegségét *de novo* mutáció okozta. Légzési elégtelenség dokumentált restriktív tüdőbetegség formájában 3/7 (43 %) esetben volt jelen, egy esetben a légzési elégtelenség 6 éves korra halálhoz vezetett. Agyidegi érintettségre utaló góctüneteket a betegek 60 %-ában találtunk, a III, VII, IX és XII agyidegeket érintette. A betegség progressziója gyors, közepes és lassú volt a különböző mutációktól függően. *In vitro* funkcionális vizsgálatokat végeztünk, (transzkripciós aktivitás és nukleáris lokalizációs vizsgálatok) tranziens transzfekciós kísérletekben *in vitro* mutagenézissel generált konstrukciókat felhasználva. Az *in vitro* adatokat korreláltuk a betegség súlyosságával, a tünetek

jelentkezésének időpontjával illetve a progresszió sebességével mérve. Nem találtunk korrelációt a mutációk és a betegség lefolyása között, ezért nagyon nehéz prognosztizálni ezeket a betegeket. Mégis a tanulmány megerősítette, hogy légzési elégtelenség és agyideg diszfunkció gyakori *EGR2* mutációkkal és segíthet a molekuláris diagnosztika sorrendjének meghatározásában.

3. A kohortunk szűrése során új *SIMPLE* mutációkat azonosítottunk, valamint feltehetően patogénikus szekvencia változatokat és ritka polimorfizmusokat találtunk. *SIMPLE* mutációk mind demyelinizációs, mind axonális neuropátiát okozhatnak. Bioinformatikai analízis arra utal, hogy *SIMPLE* interakcióba léphet NED4-gyel vagy más WW domain tartalmú proteinnel, és clathrin adaptorként vagy E3 ubiquitin ligázként funkcionálhat.
4. Egy új *MPZ* mutációval rendelkező beteg kapcsán megmutattuk, hogy a perifériás beidegzés diszfunkciója megváltoztathatja az izom differenciálódását, és hogy nem specifikus izombiopsziás kép és ultrastrukturális elváltozások neuropátiával összeegyeztethetőek, és hogy a nem-myelinizált axonok által okozott A és Z sávok felrostozódása megelőzheti a denerváció klasszikus képét.

Felhasznált irodalom:

1. **Kinga Szigeti**, MD, Gulam Mustafa Saifi, PhD, Dawna Armstrong, MD, John W. Belmont, MD, PhD , Geoffrey Miller, MB, MPhil, MD and James R. Lupski, MD, PhD:

Disturbance of muscle fiber differentiation in congenital hypomyelinating neuropathy caused by a novel myelin protein zero mutation. Ann Neurol. 2003 Sep; 54(3): 398-402.

2. Gulam Mustafa Saifi, **Kinga Szigeti**, G. Jackson Snipes , Carlos A. Garcia and James R Lupski: *Molecular mechanisms, diagnosis, and rational approaches to management of and therapy for Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies.* J Investig Med. 2003 Sep; 51(5): 261-83. Review.

3. Saifi GM, **Szigeti K**, Wiszniewski W, Shy ME, Krajewski K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochanski A, Reeser S, Mancias P, Butler I, Lupski JR: *SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation.* Hum Mutat. 2005 Apr;25(4):372-83

4. **Kinga Szigeti**, Carlos A. Garcia and James R. Lupski: *Charcot-Marie-Tooth disease and related hereditary polyneuropathies: molecular diagnostics determine aspects of medical management.* Genetics in Medicine. 2006 Feb;8(2):86-92

További publikációk:

1. **Szigeti K.** Thomas GV. Murphy M. Draetta G. Pagano M. Loda M. *Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases.* American Journal of Pathology. 153(3):681-7, 1998 Sep.
2. Reiter RE. Gu Z. Watabe T. Thomas G. **Szigeti K.** Davis E. Wahl M. Nisitani S. Yamashiro J. Le Beau MM. Loda M. Witte ON. *Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95(4):1735-40, 1998 Feb 17.
3. Pawel Stankiewicz, Sau Wai Cheung, Christine J. Shaw, Reza Saleki, **Kinga Szigeti**, James R. Lupski: *The donor chromosome breakpoint for a jumping translocation is associated with large low-copy repeats in 21q21.3.* Cytogenet Genome Res. 2003; 101(2): 118-23.
4. **Kinga Szigeti, MD**, Lee-Jun C. Wong, PhD, Cherng-Lih Perng, Gulam Mustafa saifi, PhD, Karen Eldin, MD, Adekunle M. Adesina, MD, PhD, Darrell L. Cass, MD, Michio Hirano, MD, James R. Lupski, MD, PhD, and Fernando Scaglia, MD:
MNGIE with lack of skeletal muscle involvement and a novel TP splice-site mutation. Journal of Medical Genetics. 2004 Feb;41(2):125-9.
5. Svetlana A. Yatsenko, Alexander N. Yatsenko, **Kinga Szigeti**, Pawel Stankiewicz, Sau W. Cheung, James R. Lupski: *Interstitial deletion 10p and atrial septal defect in DiGeorge 2 syndrome.* Clinical Genetics. 2004 Aug;66(2):128-36

6. **K. Szigeti**, N. Sule, A. M. Adesina, D. L. Armstrong, G. M. Saifi, E. Bonilla, M. Hirano and J. R. Lupski: *Increased blood brain barrier permeability caused by loss of function of thymidine phosphorylase in patients with MNGIE*. Ann Neurol. 2004 Dec;56(6):881-6

7. Michael E. Shy, Mena T. Scavina, Alisa Clark, Karen M. Krajewski, John Kamholz, Edwin Kolodny, **Kinga Szigeti**, Gulam Mustafa Saifi, Steven S. Scherer and James R. Lupski: *The T118M Substitution in PMP22 Causes a Partial Loss of Function and Neuropathy Resembling HNPP*. Ann Neurol. 2006 Feb;59(2):358-64.